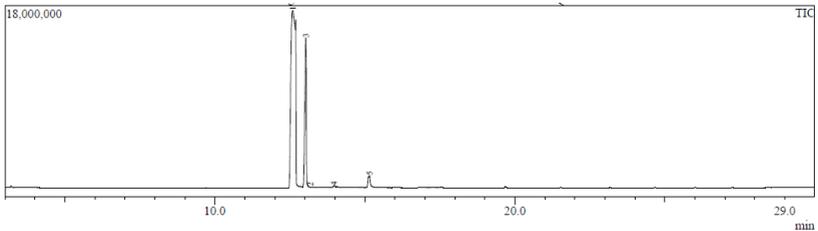


## BAB IV PEMBAHASAN

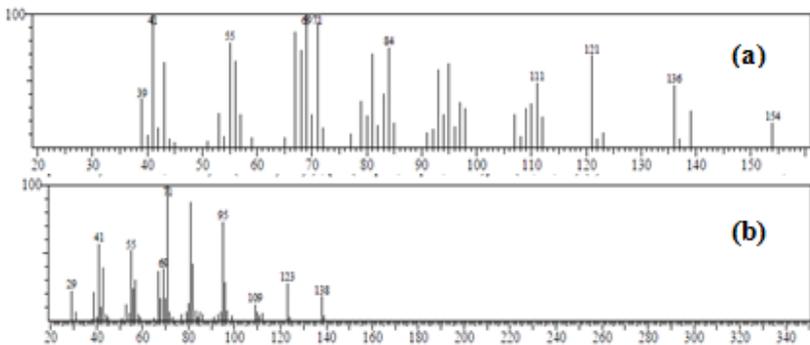
### 4.1 Analisis Hasil Uji *In vitro*

#### 4.1.1 Analisis substrat (starting material) Campuran (-)-Isopulegol dan l-Mentol

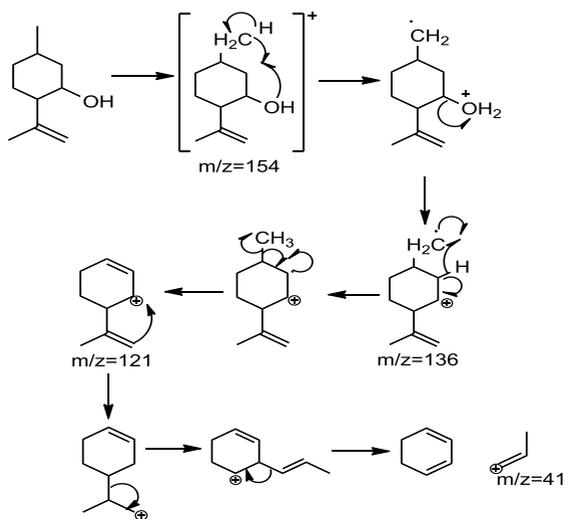
Senyawa (-)-isopulegol dan l-mentol sintetis terlebih dahulu dilakukan analisis menggunakan KG-SM untuk mengetahui tingkat kemurniannya. Kromatogram hasil analisis KG disajikan pada **gambar 4.1** dan spektra MS disajikan pada **gambar 4.2**. Sementara mekanisme fragmentasi disajikan pada **gambar 4.3** dan **gambar 4.4**



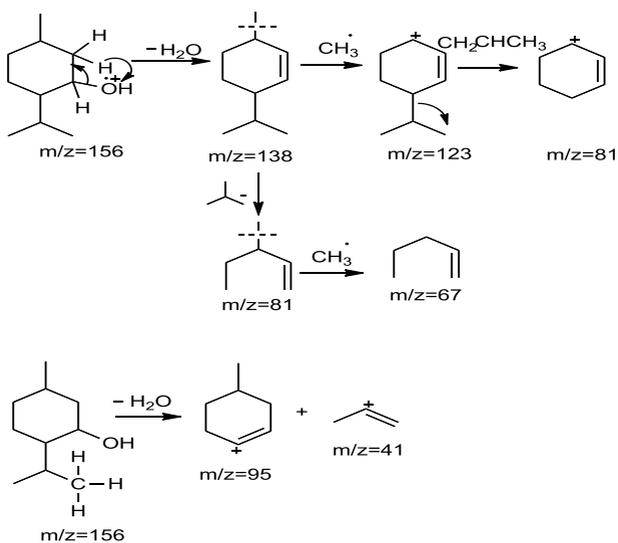
**Gambar 4. 1** Kromatogram KG-SM Campuran (-)-Isopulegol dan l-Mentol



**Gambar 4.2** Spektra MS puncak (a)(-)-isopulegol  $t_R=12,592$  (b)l-mentol dengan  $t_R= 13,03$



**Gambar 4.3** Mekanisme fragmentasi (-)-isopulegol



**Gambar 4.4** Mekanisme fragmentasi l-mentol

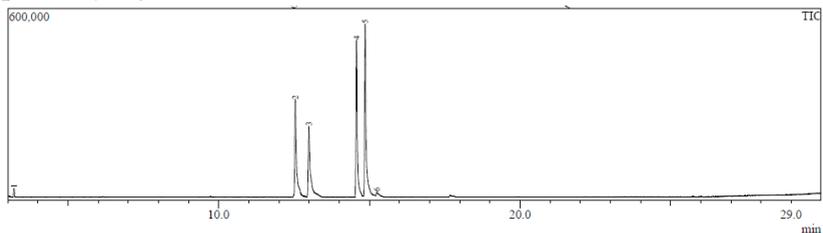
Berdasarkan kromatogram KG-SM pada **gambar 4.1** terlihat dua puncak yang menunjukkan kadar isopulegol sebesar 75,89%

dengan waktu retensi 12,592 menit dan mentol sebesar 21,46% dengan waktu retensi 13,030 menit. Berdasarkan spektra MS pada **gambar 4.2** diperoleh puncak fragmentasi (-)-isopulegol pada 41, 121, 136, 154 yang telah dijelaskan pada **gambar 4.3** mekanisme fragmentasi dari spektra MS tersebut dan puncak fragmentasi l-mentol pada 41, 67, 81, 95, 123, 138 yang telah dijelaskan pada **gambar 4.4** mekanisme fragmentasi dari spektra MS.

#### **4.1.2 Peran Asam Asetat Anhidrida dan Vinil Asetat sebagai Sumber Asil dalam Reaksi Asilasi Campuran (-)-Isopulegol dan l-Mentol**

Peran asam asetat anhidrida dan vinil asetat sebagai sumber asil dalam penelitian ini diuji melalui reaksi asilasi terhadap campuran (-)-isopulegol dan l-mentol selama 24 jam pada temperatur 50°C. Perbandingan substrat dengan sumber asil yang digunakan adalah mol(-)-isopulegol:mol l-mentol:mol asam asetat anhidrida (1:1:3) serta pelarut yang digunakan yaitu n-heksana. Hasil reaksi dianalisis menggunakan KG-SM dan FTIR.

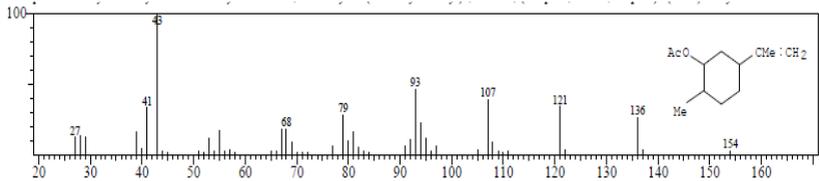
Kromatogram KG pada jam ke-24 hasil reaksi asilasi campuran (-)-isopulegol dan l-mentol disajikan pada **gambar 4.5**. Berdasarkan **gambar 4.5** terlihat 6 puncak yang menandakan banyak produk yang terbentuk.



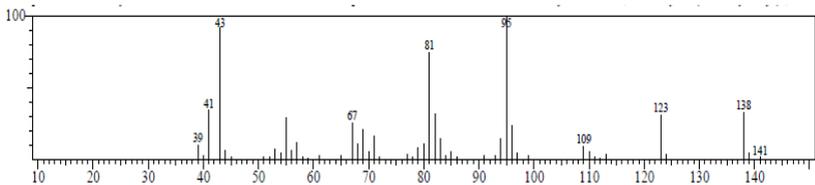
**Gambar 4.5** Kromatogram senyawa hasil reaksi asilasi campuran (-)-isopulegol dan l-mentol

Produk utama dari asilasi campuran (-)-isopulegol dan l-mentol dengan sumber asil asam asetat anhidrida serta pelarut n-heksana yaitu (-)-isopulegil asetat dan l-mentil asetat. Pada gambar 4.5 terlihat (-)-isopulegil asetat berada pada puncak ke-4 dengan

%area sebesar 26,03% dan l-mentil asetat berada pada puncak ke -5 dengan %area sebesar 33,66% (**Lampiran D.6**). Spektra massa (-)-isopulegil asetat dan l-mentil asetat seperti pada **gambar 4.6** dan **gambar 4.7**.

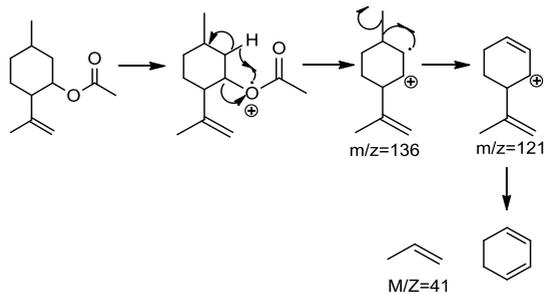


**Gambar 4.6** Spektra massa puncak ke-4 pada kromatogram



**Gambar 4.7** Spektra massa puncak ke-5 pada kromatogram dengan tR 14,861 menit

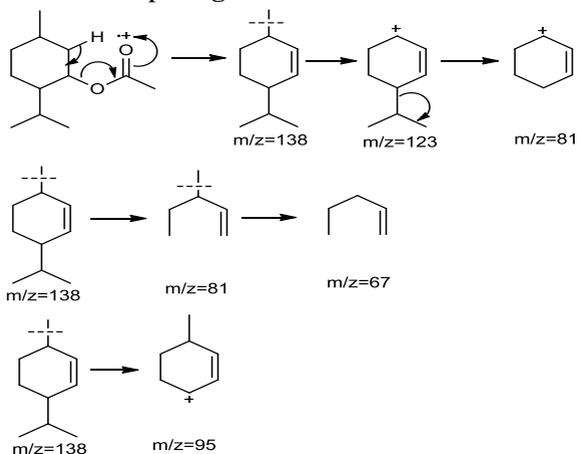
Dari spektra massa pada **gambar 4.6** muncul beberapa puncak m/z dari (-)-isopulegil asetat diantaranya yaitu puncak 154,136,121,107,93,79,68,43,41,27. Mekanisme fragmentasi (-)-isopulegil asetat berdasarkan puncak-puncak m/z diusulkan pada **gambar 4.8**



**Gambar 4.8** Pola fragmentasi puncak ke-4 dengan  $t_R$  14,575 menit

Berdasarkan data KG-SM yang terlihat pada (**Lampiran D.6**) menunjukkan bahwa (-)-isopulegil asetat telah terbentuk dengan %area sebesar 26,03% sedangkan %area isopulegol turun dari 75,89% menjadi 22,5% sehingga data yang diperoleh menunjukkan bahwa (-)-isopulegol bereaksi dengan asam asetat anhidrida membentuk isopulegil asetat.

Dari spektra massa pada **gambar 4.7** muncul beberapa puncak  $m/z$  dari l-mentil asetat diantaranya yaitu 141,138,123,109,95,81,67, 43. Mekanisme fragmentasi l-mentil asetat berdasarkan puncak-puncak  $m/z$  diusulkan pada **gambar 4.9**



**Gambar 4.9** Pola fragmentasi puncak ke-5 dengan  $t_R$  14,861 menit

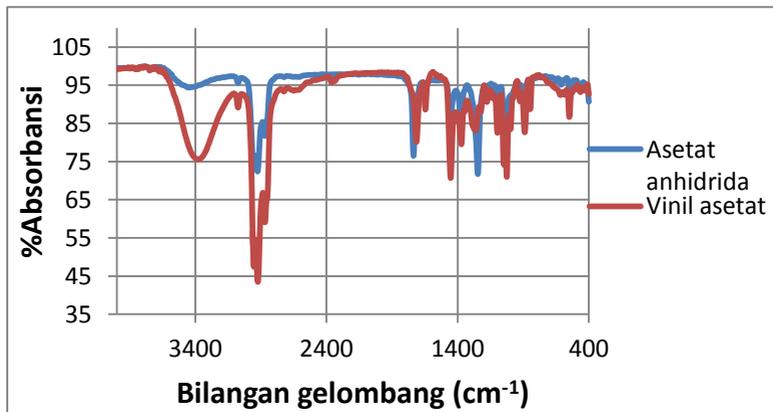
Berdasarkan data KG-SM yang terlihat pada (**Lampiran D.6**) menunjukkan bahwa l-mentil asetat telah terbentuk dengan %area sebesar 33,66% sedangkan %area l-mentol turun dari 21,46% menjadi 16,11% sehingga data yang diperoleh menunjukkan bahwa l-mentol bereaksi dengan asam asetat anhidrida membentuk l-mentil asetat.

Kemudian penelitian dilanjutkan dengan mengamati reaksi asilasi (-)-isopulegol dan l-mentol menggunakan sumber asil vinil

asetat. Reaksi asilasi dilakukan selama 24 jam pada temperatur 50°C. Perbandingan substrat dengan sumber asil yang digunakan adalah mol(-)-isopulegol:mol l-mentol:mol vinil asetat (1:1:3) serta pelarut yang digunakan yaitu n-heksana. Hasil reaksi dianalisis menggunakan KG-SM dan FTIR.

Berdasarkan data KG-SM yang terlihat pada (**Lampiran E.6**) pada jam ke-24 reaksi tidak terbentuk produk (-)-isopulegilel asetat dan l-mentil asetat. Hal tersebut menandakan (-)-isopulegilel asetat dan l-mentil asetat telah terhidrolisis menjadi (-)-isopulegolel dan l-mentol.

Selanjutnya dilakukan overlay spektra FTIR pada reaksi asilasi enzimatis jam ke-24 antara sumber asil asam asetat anhidrida dengan vinil asetat. Hal ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan spektra yang terbentuk antara spektra reaksi dengan sumber asil asam asetat anhidrida dengan spektra reaksi dengan sumber asil vinil asetat disajikan pada **gambar 4.10**



**Gambar 4.10** Overlay FTIR reaksi asilasi sumber asil asam asetat anhidrida dengan sumber asil vinil asetat

Pada **gambar 4.10** menunjukkan bahwa spektra reaksi asilasi menggunakan sumber asil asam asetat anhidrida dengan spektra reaksi asilasi menggunakan sumber asil vinil asetat terdapat

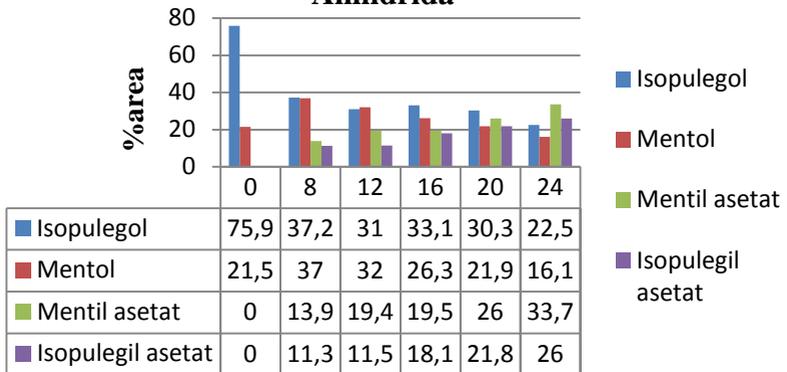
perbedaan. Pada spektra reaksi menggunakan sumber asil asam asetat anhidrida terlihat gugus hidroksi (-O-H) dengan intensitas yang lebih rendah dibandingkan reaksi asilasi menggunakan sumber asil vinil asetat yang menunjukkan bahwa isopulegol dan mentol berkurang dan terbentuk produk asilasi. Pada spektra sumber asil asam asetat anhidrida terdapat serapan (C-O) ester pada dan (C=O) karbonil yang menandakan bahwa telah terbentuk produk ester yang kemungkinan merupakan senyawa target yaitu (-)-isopulegil asetat dan l-mentil asetat.

Dari kedua kondisi reaksi tersebut dapat dilihat bahwa kondisi reaksi enzimatis yang paling efektif yaitu pada sumber asil asetat anhidrida. Pada %area kondisi reaksi enzimatis menggunakan sumber asil asam asetat anhidrida lebih selektif terhadap pembentukan (-)-isopulegil asetat dan l-mentil asetat. Pada sumber asil asam asetat anhidrida konversi pembentukan (-)-isopulegil asetat dan l-mentil asetat mencapai 76,89% dan 83,45% (**lampiran C.5**) sedangkan pada sumber asil vinil asetat konversi pembentukan (-)-isopulegil asetat dan l-mentil asetat mencapai 64,84% dan 47,15% (**lampiran C.6**). Hal ini selaras dengan selektivitas lipase terhadap pembentukan (-)-isopulegil asetat dan l-mentil asetat mencapai 21,52% dan 34,58% (**lampiran C.5**) pada sumber asil asam asetat anhidrida sedangkan pada sumber asil vinil asetat selektivitas lipase sebesar 0% (**lampiran C.6**).

#### **4.1.3 Pengaruh waktu dan sumber asil terhadap reaksi enzimatis asilasi campuran (-)- Isopulegol dan l-Mentol**

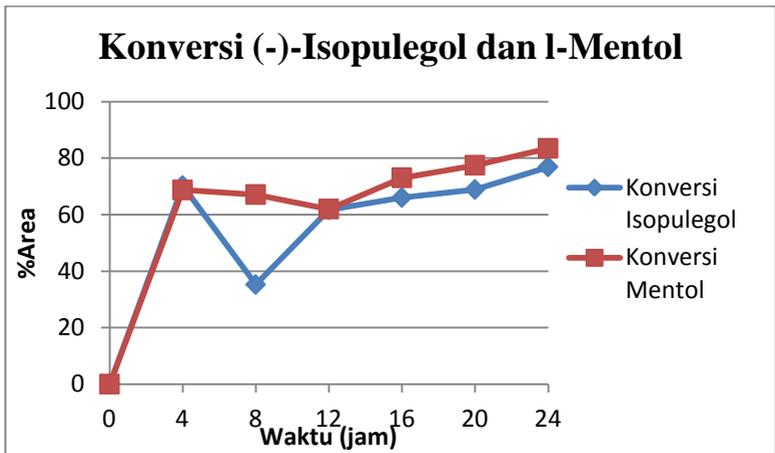
Pengaruh waktu reaksi asilasi campuran (-)-isopulegol dan l-mentol pada 50°C diamati selama 24 jam dan dilakukan pencuplikan setiap 4 jam sekali. Sumber asil yang digunakan pada reaksi ini yaitu asam asetat anhidrida dan vinil asetat. Setiap 4 jam hasil reaksi dicuplik dan dianalisis menggunakan instrumentasi KG-SM. Hasil pengamatan dalam 24 jam disajikan dalam grafik seperti pada **gambar 4.11** Selanjutnya diamati puncak-puncak senyawa utama yaitu isopulegol, mentol, isopulegil asetat dan mentil asetat.

### Hubungan waktu dan %area reaksi asilasi enzimatis dengan sumber asil Asam Asetat Anhidrida

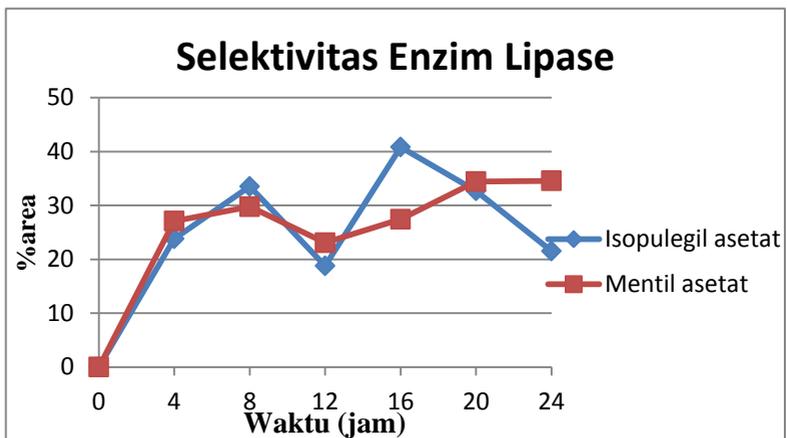


**Gambar 4.11** Grafik hubungan %area dengan waktu pada reaksi asilasi dengan sumber asil asetat anhidrida pada temperatur 50°C

Berdasarkan pada **gambar 4.11** profil jam ke-0 hingga jam ke-20 % area isopulegil asetat semakin meningkat. Hal ini dikarenakan isopulegol telah bereaksi dengan asam asetat anhidrat membentuk senyawa ester berupa isopulegil asetat. Hal ini sesuai dengan menurunnya %area isopulegol dilihat dari profil jam ke-0 hingga jam ke-24. Pada % area mentil asetat juga semakin meningkat, dikarenakan reaksi antara mentol dengan asam asetat anhidrida. Hal ini sesuai dengan menurunnya %area mentol dilihat dari profil jam ke-0 hingga jam ke-24. Sehingga dapat disimpulkan bahwa sisi aktif lipase efektif dalam berikatan dengan mentol dan asam asetat anhidrida.

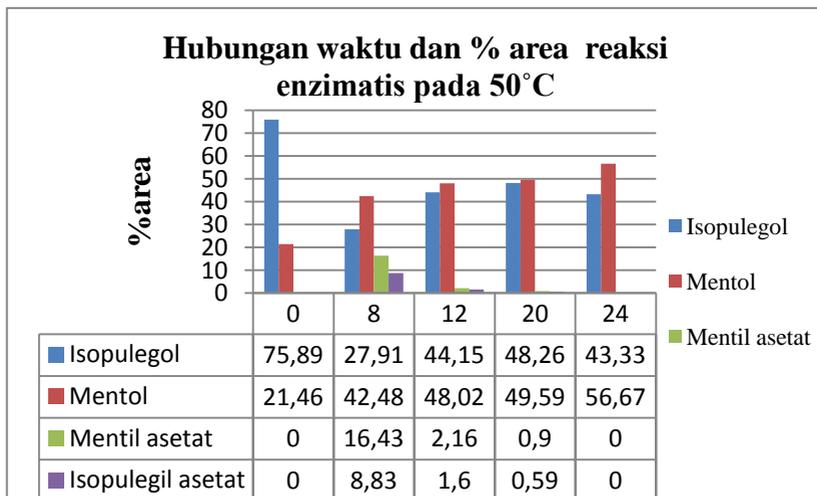


**Gambar 4.12** Grafik konversi reaksi enzimatik dengan sumber asil asam asetat anhidrida



**Gambar 4.13** Grafik selektivitas enzim lipase terhadap pembentukan (-)-isopulegyl asetat dan l-menthyl asetat

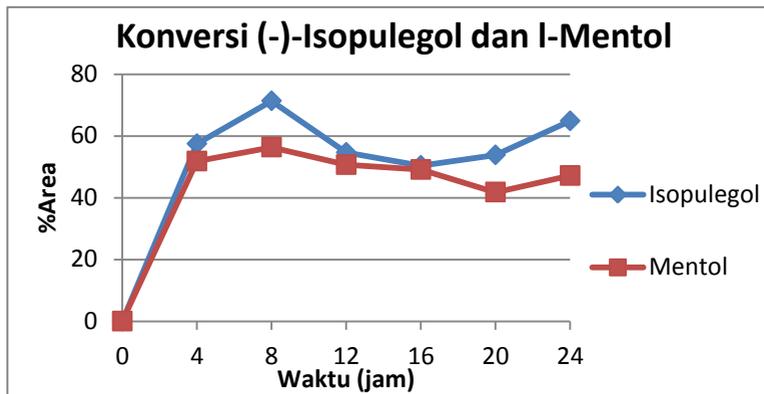
Dari data KG-SM running selama 24 jam (**lampiran D**) diperoleh %konversi dan %selektivitas per 4 jam seperti yang terlihat pada **gambar 4.12** dan **gambar 4.13**. % konversi tertinggi berada pada senyawa mentol yaitu sebesar 83,45% pada jam ke-24 reaksi. Hal tersebut disebabkan karena pada campuran (-)-isopulegol dan l-mentol, sumber asil asam asetat anhidrida cenderung berinteraksi dengan senyawa l-mentol. Hal tersebut juga dapat dilihat pada % selektivitas. %selektivitas tertinggi berada pada pembentukan senyawa mentil asetat yaitu sebesar 34,58%.



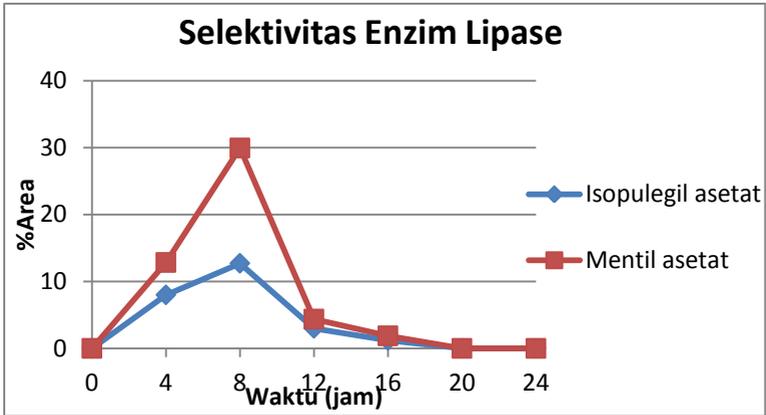
**Gambar 4.14** Grafik hubungan %area dengan waktu pada reaksi asilasi enzimatis dengan sumber asil vinil asetat

Berdasarkan pada **gambar 4.5** pada jam ke-8 telah terbentuk isopulegil asetat kemudian pada jam ke-12 hingga jam ke-24 mengalami penurunan yang drastis. Penurunan %area isopulegil asetat dikarenakan terjadinya reaksi hidrolisis dari isopulegil asetat menjadi isopulegol dan terbentuknya pengotor. %area mentil asetat juga mengalami penurunan drastis karena kemungkinan sisi aktif lipase *Rhizomucor miehei* telah jenuh sehingga jumlah isopulegil asetat maupun mentil asetat tidak bertambah.

Berdasarkan data luas area KG-SM *running* selama 24 jam temperatur 50°C (**lampiran C.5 dan C.6**) didapatkan %selektifitas dan %konversi dari reaksi asilasi enzimatis setiap 4 jam. Terlihat grafik pada **gambar 4.6** didapatkan sebagian besar %selektifitas enzim lipase sebesar 0% sehingga tidak terjadi pembentukan isopulegil asetat. %konversi terendah pada jam ke-12 sebesar -137%. Sedangkan grafik pada **gambar 4.7** didapatkan %selektifitas enzim lipase tertinggi pada jam ke-12 sebesar 5,33%. %konversi tertinggi pada jam ke-12 sebesar 545,9%.



**Gambar 4.15** Grafik konversi (-)-isopulegol dan l-mentol dengan sumber asil vinil asetat



**Gambar 4.16** Grafik selektivitas enzim lipase dengan sumber asil vinil asetat

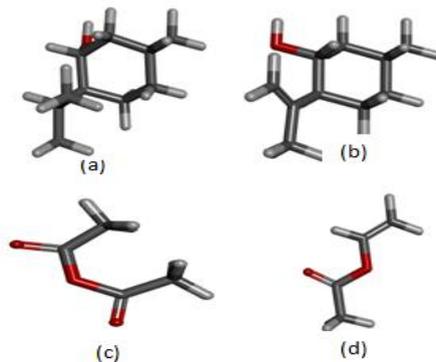
Dari data KG-SM running selama 24 jam (**lampiran E**) diperoleh %konversi dan %selektivitas per 4 jam seperti yang terlihat pada **gambar 4.15** dan **gambar 4.16**. Pada **gambar 4.15** dari profil jam ke-0 hingga jam ke-24 %konversi berada pada senyawa mentol. Hal tersebut disebabkan karena pada campuran (-)-isopulegol dan l-mentol, sumber asil vinil asetat cenderung berinteraksi dengan senyawa l-mentol. Hal tersebut juga dapat dilihat pada % selektivitas. %selektivitas tertinggi berada pada pembentukan senyawa mentil asetat yaitu sebesar 29,94% pada jam ke-8 reaksi.

Apabila diamati antara data konversi dengan selektivitas (**lampiran C.5** dan **lampiran C.6**) dapat ditunjukkan bahwa besar konversi substrat lebih tinggi daripada besar selektivitas pembentukan produk. Hal tersebut disebabkan karena pada konversi substrat campuran (-)-isopulegol dan l-mentol tidak hanya membentuk produk (-)-isopulegил asetat maupun l-mentil asetat namun produk-produk pengotor juga ikut terbentuk. Sedangkan pada selektivitas menunjukkan kemampuan enzim lipase dalam membentuk (-)-isopulegил asetat maupun l-mentil asetat.

## 4.2 Analisis Hasil Uji *In silico*

### 4.2.1 Preparasi Struktur Geometri Ligan secara *In silico*

Metode *In Silico* melalui pemodelan komputer dilakukan untuk mengetahui dan memprediksikan interaksi molekuler yang terjadi antara ligan dengan residu-residu makromolekul protein. Pemodelan ligan dilakukan pada struktur 3D yang diawali dengan pengunduhan senyawa (-)-isopulegol, L-mentol, vinil asetat, asetat anhidrida dari *ChemSpider Search and Share Chemistry*. Kemudian dilakukan tahap preparasi dari masing-masing ligan dengan cara optimasi struktur geometri menggunakan perangkat lunak *HyperChem*. Optimasi dilakukan untuk memperoleh konformasi struktur ligan yang paling stabil. Hasil optimasi yang diperoleh disimpan dengan format file *hin* yang kemudian dikonversi ke bentuk file *pdb* menggunakan *Open Babel GUI* agar dapat dibaca oleh perangkat lunak *iGEMDOCK*.

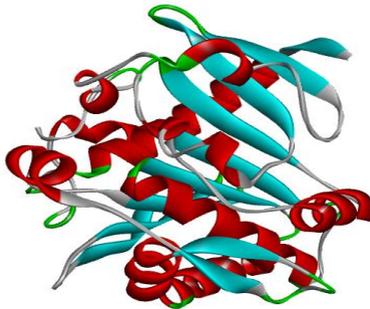


**Gambar 4.17** Struktur hasil optimasi ligan senyawa (a)(-)-isopulegol(b)l-mentol(c)asam asetat anhidrida(d)vinil asetat

### 4.2.2 Preparasi Struktur Makromolekul 3TGL *Triacylglycerolacyl hidrolase*

Makromolekul yang digunakan sebagai reseptor pada pemodelan molekuler secara *In silico* dalam penelitian ini adalah reseptor enzim *Rhizomucor miehei* yang diunduh dari [www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/) dengan kode akses 3TGL. Makromolekul dengan kode 3TGL tersebut merupakan *Triacylglycerol acylhidrolase* (EC 3.1.1.3) dengan resolusi 1,9 Å. Resolusi protein mengindikasikan terhadap 30

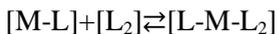
detail tiap-tiap atom pada tiap residu pada saat dikristalisasi. Semakin kecil angka resolusi maka akan semakin bagus. Resolusi dikatakan bagus apabila memiliki angka lebih kecil dari 2,5 Å [41]. Makromolekul yang diunduh merupakan makromolekul kompleks 3D protein yang mengandung air sehingga perlu dilakukan optimasi. Optimasi dilakukan agar kandungan air hilang sehingga memperoleh makromolekul yang hanya mengandung reseptor protein saja karena keberadaan senyawa lain dalam protein dapat menghambat masuknya molekul ligan yang ditarget. Pengoptimasian makromolekul menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer 2016 Client*.



**Gambar 4.18** Struktur makromolekul 3TGL hasil optimasi dengan menggunakan *Discovery Studio Visualizer 2016 Client*

#### 4.2.3 *Multiple Docking*

*Multiple docking* digunakan untuk mengetahui interaksi ligan isopulegol, mentol, asetat anhidrida dengan makromolekul enzim dan interaksi isopulegol, mentol, vinil asetat dengan makromolekul enzim dimana interaksi yang terjadi sesuai dengan persamaan berikut:



Keterangan:

M = Makromolekul

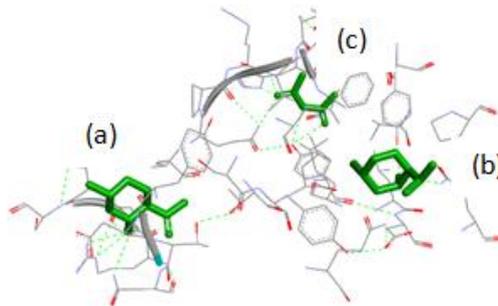
L = Ligan mentol dan isopulegol

L<sub>2</sub> = Ligan asetat anhidrida ataupun vinil asetat

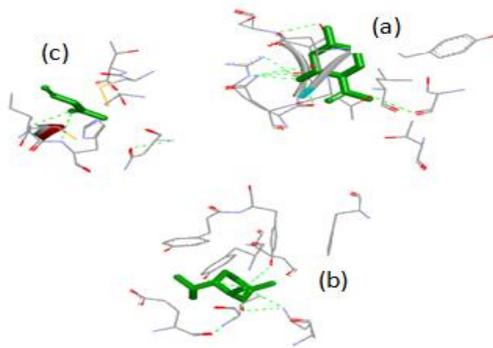
Proses *multiple docking* dilakukan menggunakan program iGEMDOCK v2.1 dimana setiap proses docking menghasilkan Energi binding affinity (Energi Gibbs), energi Ikatan van der Waals dan energi ikatan hidrogen. Energi Gibbs merupakan ukuran kemampuan ligan untuk berikatan dengan reseptor. Semakin kecil nilai *binding affinity* maka afinitas antara reseptor dengan ligan semakin tinggi dan apabila semakin besar nilai *binding affinity* maka afinitas antara reseptor dengan ligan semakin rendah[42]. Energi Gibbs berhubungan dengan konstanta inhibisi ( $K_i$ ). Hubungan Energi Gibbs dengan konstanta inhibisi ditunjukkan pada **persamaan 4.1**[41]. Konstanta inhibisi dapat memberikan gambaran mengenai afinitas antara ligan dengan enzim. Afinitas ini dipengaruhi oleh ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, elektrostatik dan gaya van der waals.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_A \quad K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad (4.1)$$

Hasil *multiple docking* dari ligan mentol, isopulegol, asetat anhidrida dengan makromolekul serta ligan mentol, isopulegol, vinil asetat, asetat anhidrida dengan makromolekul pada **gambar 4.11** dan **4.12**



**Gambar 4.19** Hasil multiple docking ligan(a)(-)-isopulegol(b)l-mentol(c)asam asetat anhidrida dengan makromolekul

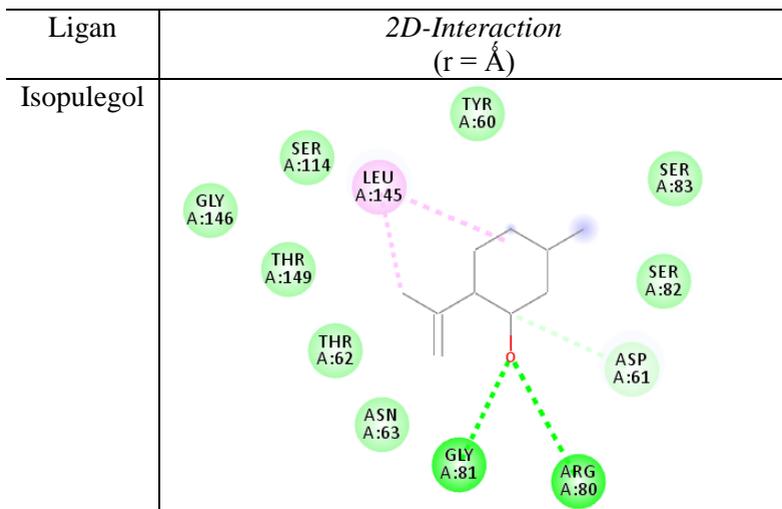


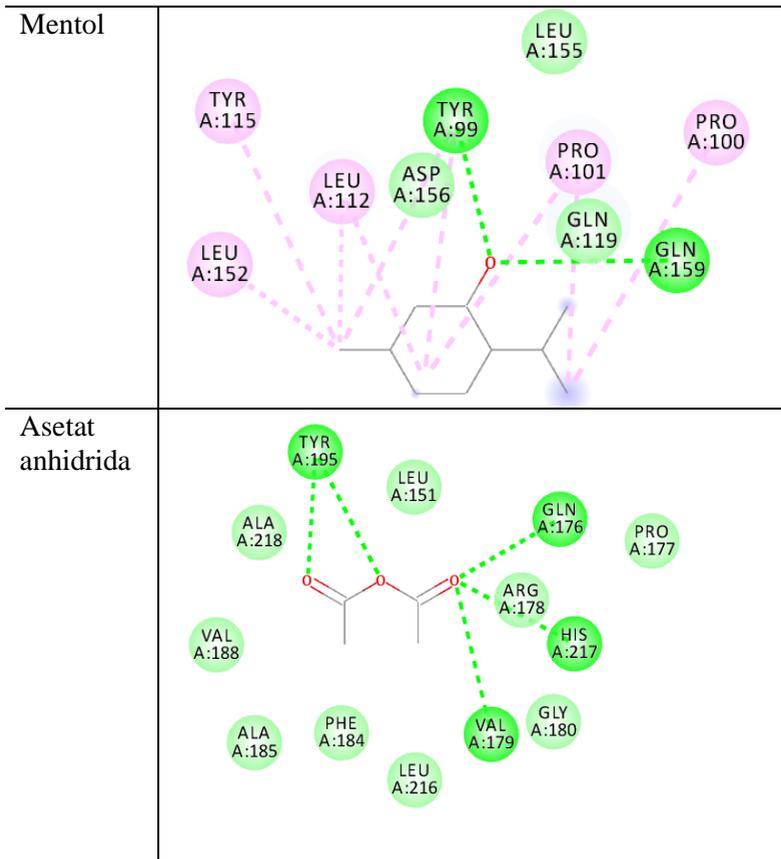
**Gambar 4.20** Hasil multiple docking (a)(-)-isopulegol(b)l-mentol(c)vinil asetat dengan makromolekul

#### 4.2.4 Interaksi antara Ligan dengan Makromolekul

Hasil multiple docking menggunakan program iGEMDOCK kemudian divisualisasikan interaksi antara ligan dengan reseptor *Triacylglycerolacyl hidrolase* 3TGL dalam bentuk 2D maupun 3D menggunakan *Discovery Studio 2016 Client*

**Tabel 4.1** Model interaksi 2D antara ligan senyawa alkohol campuran isopulegol dan mentol, asetat anhidrida dengan reseptor *Triacylglycerolacylhidrolase* 3TGL





Pada **tabel 4.1** dan **tabel 4.3** , dapat diketahui bahwa adanya garis putus-putus berwarna hijau menunjukkan ikatan hidrogen. Sedangkan, garis putus-putus berwarna merah muda menunjukkan ikatan antara sisi aktif enzim dengan alkil dari l-menthol dan (-)-isopulegol.

Berdasarkan **tabel 4.1**, dapat diketahui bahwa Arginin pada rantai asam amino nomor 80, Glisin pada rantai 81, berikatan hidrogen dengan (-)-isopulegol. Selain itu, alkil dan siklik enam dari (-)-isopulegol berikatan dengan Leusin pada rantai atom 145 melalui ikatan alkil. Sementara itu untuk sisi aktif yang berikatan dengan l-mentol yaitu Tirosin pada rantai 99 dan Glutamin pada rantai 159. Sedangkan sisi aktif yang berikatan hidrogen dengan asam asetat

anhidrida yaitu Tirosin pada rantai 195, Glutamin pada rantai 176, Histidin pada rantai 217 dan Valin pada rantai 179.

Energi gibbs yang diperoleh dari hasil docking merupakan energi yang berasal dari ikatan tiap-tiap sisi aktif dengan sumber asil (-)-isopulegol maupun l-mentol. Energi gibbs yang diperoleh berharga minus, yang menunjukkan bahwa reaksi terjadi secara spontan. Harga  $\Delta G^0$  tersebut dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\Delta G^0 = -RT \ln[Kd] \quad (4.2)$$

Berikut tabel data energi dari hasil docking untuk docking antara makromolekul, (-)-isopulegol, l-menthol, dan asam asetat anhidrida (**Tabel 4.2**).

**Tabel 4.2** Data Energi hasil docking dengan sumber asil asam asetat anhidrida

Ligan	$\Delta G^0$	VDW	HBond	Kd
Asam asetat anhidrid	-57,8457	-42,1154	-15,7303	1,094
(-)-isopulegol	-55,9209	-44,5757	-11,3452	1,091
l-menthol	-49,142	-41,8039	-7,6081	1,079

Kd merupakan konstanta disosiasi atau konstanta pengionan dan sering disebut konstanta ketidakstabilan. Makin besar harga Kd, maka semakin kurang stabil dan kompleksnya semakin lemah atau mudah terpecah menjadi komponen-komponennya dan sebaliknya. Harga Kd asam asetat anhidrida lebih besar dibandingkan harga Kd (-)-isopulegol maupun harga Kdl-mentol. Hal tersebut menunjukkan bahwa asam asetat anhidrida akan mudah terlepas dari makromolekul dan berikatan dengan ligan yang lainnya (dalam hal ini adalah (-)-isopulegol dan l-mentol).

**Tabel 4.3** Model interaksi 2D antara ligan senyawa alkohol campuran isopulegol dan mentol, vinil asetat dengan reseptor Triacylglycerolacylhidrolase 3TGL

Ligan	<i>2D-Interaction</i> ( $r = \text{Å}$ )
-------	---

Isopulegol	
Mentol	
Vinil asetat	

Berdasarkan **tabel 4.3**, dapat diketahui bahwa Glisin pada rantai asam amino nomor 81, Arginin pada rantai 80, berikatan

dengan alkil (-)-isopulegol. Selain itu, alkil dan siklik enam dari (-)-isopulegol berikatan dengan Leusin pada rantai atom 145 melalui ikatan alkil. Sementara itu untuk sisi aktif yang berikatan dengan l-mentol yaitu Tirosin pada rantai 76, Tirosin pada rantai 20, Threonin pada rantai 74 dan Lysin pada rantai 137. Sedangkan sisi aktif yang berikatan hidrogen dengan asam asetat anhidrida yaitu Tirosin pada rantai 195, Glutamin pada rantai 176, Histidin pada rantai 42.

Energi gibbs yang diperoleh dari hasil docking merupakan energi yang berasal dari ikatan tiap-tiap sisi aktif dengan sumber asil (-)-isopulegol maupun l-mentol. Energi gibbs yang diperoleh berharga minus, yang menunjukkan bahwa reaksi terjadi secara spontan. Harga  $\Delta G^0$  tersebut dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\Delta G^0 = -RT \ln[Kd] \quad (4.3)$$

Berikut tabel data energi dari hasil docking untuk docking antara makromolekul, (-)-isopulegol, l-menthol, dan vinil asetat (**Tabel 4.4**).

**Tabel 4.4** Data energi hasil docking dengan sumber asil vinil asetat

Ligan	$\Delta G^0$	VDW	HBond	Kd
Vinil asetat	-46,1007	-33,7114	-12,3893	1,074
(-)-isopulegol	-55,9328	-44,432	-11,5008	1,091
l-menthol	-48,6571	-38,0591	-10,598	1,065

Berdasarkan **tabel 4.4**, Harga Kd (-)-isopulegol lebih besar dibandingkan harga Kd asam asetat anhidrida. Hal tersebut menunjukkan bahwa (-)-isopulegol lebih mudah terlepas dari makromolekul dan berikatan dengan ligan yang lainnya (dalam hal ini adalah vinil asetat). Sedangkan untuk l-mentol, harga Kd lebih kecil dibandingkan harga Kd vinil asetat. Hal tersebut menunjukkan bahwa vinil asetat lebih mudah terlepas dari makromolekul dan berikatan dengan ligan yang lainnya (dalam hal ini adalah l-mentol).

Berdasarkan disosiasi molekul, asam asetat anhidrid mampu membentuk ion asetat dengan harga Kd sebesar 1,094. Sementara itu, vinil asetat mampu membentuk ion vinilat dengan Kd sebesar 1,074.

Hal tersebut menunjukkan bahwa antara hasil docking dengan teori bersesuaian dikarenakan Kd dari asam asetat anhidrid lebih besar jika dibandingkan Kd vinil asetat. Hal itu yang menjadikan asam asetat anhidrid lebih mudah untuk melepaskan asil dan mendonorkannya kepada substrat (-)-isopulegol maupun l-mentol sehingga reaksi asilasi menggunakan asam asetat anhidrid lebih mudah terjadi.

Apabila dibandingkan dengan ikatan yang terjadi pada asil dari asam asetat anhidrat, sisi aktif yang berikatan dengan kedua sumber asil tersebut berbeda. Pada asam asetat anhidrat, sisi aktif yang berikatan dengan asil adalah Tyrosin, Glutamin, Histidin, Valin. Sedangkan pada vinil asetat, sisi aktif yang berikatan dengan asil adalah histidin. Kedua asil tersebut sama-sama mengikat Histidin, tetapi pada rantai asam amino yang berbeda. Dimana pada asam asetat anhidrida, histidin yang berikatan dengan asil adalah nomor 217 dan pada vinil asetat adalah histidin nomor 42. Sehingga, hal tersebut yang kemungkinan menyebabkan asam asetat anhidrat mempunyai kemampuan sebagai donor asil yang lebih bagus dibandingkan dengan vinil asetat. Selain ditinjau dari sisi aktif, perbedaan kedua sumber asil juga dapat dilihat melalui energi yang diperoleh dari hasil docking, yaitu melalui energi gibbs.

Energi gibbs yang diperoleh dari hasil docking merupakan energi yang berasal dari ikatan tiap-tiap sisi aktif dengan sumber asil ataupun l-menthol dan (-)-isopulegol. Energi gibbs yang diperoleh berharga minus, yang menunjukkan bahwa reaksi terjadi secara spontan. Pada hasil docking antara makromolekul dengan (-)-isopulegol, l-menthol dan asam asetat anhidrat, diperoleh nilai energi gibbs ( $\Delta G^0$ ) untuk makromolekul dan (-)-isopulegol sebesar -55,9209 kal/mol.  $\Delta G^0$  makromolekul dan l-mentol sebesar -49,142 kal/mol dan  $\Delta G^0$  makromolekul dan asam asetat anhidrida sebesar -57,8457 kal/mol. Harga  $\Delta G^0$  tersebut dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\Delta G^0 = -RT \ln[K_d] \quad (4.4)$$

Sehingga, melalui hasil perhitungan tersebut diperoleh nilai Kd untuk makromolekul dan (-)-isopulegol sebesar 1,091, nilai Kd untuk makromolekul dan l-mentol sebesar 1,079 dan nilai Kd untuk makromolekul dan asetat anhidrida sebesar 1,094.

Pada hasil docking antara makromolekul dengan (-)-isopulegol, l-menthol dan vinil asetat, diperoleh nilai energi gibbs ( $\Delta G^0$ ) untuk makromolekul dan (-)-isopulegol sebesar -55,9328 kal/mol.  $\Delta G^0$  makromolekul dan l-mentol sebesar -48,6571 kal/mol dan  $\Delta G^0$  makromolekul dan vinil asetat sebesar -46,1007 kal/mol. Berdasarkan perhitungan seperti pada Kd hasil docking pertama, diperoleh harga Kd makromolekul-(-)-isopulegol sebesar 1,091 dan Kd makromolekul-l-mentol sebesar 1,065 dan Kd makromolekul-vinil asetat sebesar 1,074.

Selanjutnya, harga Kd asam asetat anhidrid dan vinil asetat dibandingkan (Kd asam asetat anhidrat = 1,094 ; Kd vinil asetat = 1,074 ). Hal tersebut menunjukkan bahwa vinil asetat lebih terikat dengan makromolekul (enzim) dikarenakan harga Kd-nya lebih kecil dari Kd asam asetat anhidrid, sehingga ikatan makromolekul-vinil asetat lebih stabil. Hal tersebut menyebabkan vinil asetat sebagai sumber asil tidak mudah untuk mendonorkan asilnya ke (-)-isopulegol dan l-menthol, dikarenakan enzim dan vinil asetat terikat kuat. Oleh karena itu, jika dibandingkan dengan asam asetat anhidrat, vinil asetat tidak mampu menjadi donor asil yang baik pada reaksi asilasi.

Berdasarkan data tersebut juga dapat diketahui bahwa energi konformasi pada ikatan antara asam asetat anhidrid dengan (-)-isopulegol sebesar 16,04 kaal sementara itu energi konformasi l-mentol dengan asam asetat anhidrida sebesar 8,433 kaal. Hal tersebut menunjukkan jarak ikatan antara (-)-isopulegol dengan makromolekul lebih besar dibandingkan jarak ikatan antara l-mentol dengan makromolekul. Hal tersebut menyebabkan asam asetat anhidrida tidak dapat mendonorkan asil kepada (-)-isopulegol.

Sedangkan energi konformasi pada ikatan antara vinil asetat dengan (-)-isopulegol sebesar 9,83 kaal sementara itu energi konformasi l-mentol dengan asam asetat anhidrida sebesar 2,56 kaal. Hal tersebut menunjukkan jarak ikatan antara (-)-isopulegol dengan makromolekul lebih besar dibandingkan jarak ikatan antara l-mentol dengan makromolekul. Hal tersebut menyebabkan asam asetat anhidrida tidak dapat mendonorkan asil kepada (-)-isopulegol. .

Analisis interaksi antara ligan dengan sisi aktif residu makromolekul juga menunjukkan terjadinya interaksi *electrostatic* dan interaksi *van der Waals*. Interaksi *electrostatic* merupakan

interaksi yang terjadi karena adanya gaya tarik-menarik antara inti atom dengan elektron atom lain. Gaya ini umumnya terdapat pada senyawa yang bersifat polar. Interaksi *van der Waals* merupakan interaksi yang terjadi karena adanya gaya tarik-menarik suatu molekul akibat kepolaran dari molekul tersebut yang bersifat permanen atau terinduksi. Kepolaran permanen terjadi akibat adanya kepolaran di dalam molekul, sedangkan kepolaran tidak permanen terjadi akibat molekul terinduksi oleh partikel lain yang bermuatan sehingga molekul bersifat polar sesaat secara spontan [29].

Senyawa (-)-isopulegol dan l-menthol merupakan senyawa yang mempunyai sifat kepolaran relatif lebih rendah daripada air. Hal tersebut dikarenakan (-)-isopulegol dan l-menthol merupakan salah satu jenis senyawa alkohol. Pada umumnya, semakin panjang rantai karbon suatu alkohol maka polaritasnya semakin berkurang. Alkohol mengandung gugus hidroksil (R-OH) yang menjadi pusat interaksi yang bersifat hidrofilik. Dalam hal ini senyawa yang bertindak sebagai penginduksi merupakan ligan senyawa alkohol, sedangkan sisi aktif residu asam amino bertindak sebagai zat yang terinduksi. Sehingga makromolekul akan bermuatan sementara dan terjadi interaksi *van der Waals*. Oleh karena itu semakin banyak jumlah atom C pada senyawa ligan, maka senyawa tersebut semakin bersifat non polar atau hidrofobik, sehingga interaksi *van der Waals* yang terjadi akan semakin meningkat dan interaksi *electrostatic* akan semakin sedikit.

Pada tinjauan ini, dapat diketahui bahwa harga energi *Van der Waals* hasil docking relatif besar. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut bersifat non polar atau hidrofobik. Oleh karenanya, energi elektrostatisnya kecil. Dalam artian, senyawa yang bersifat polar (hidrofilik) juga sangat sedikit.

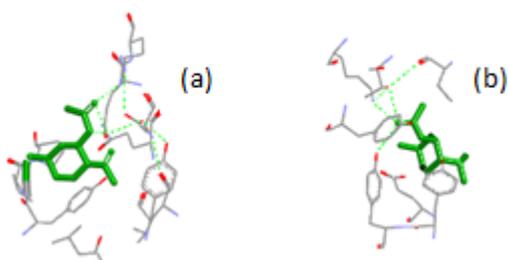
Selain menggunakan data energi docking, efektivitas sumber asil yang digunakan juga dapat ditinjau melalui harga hidrofobisitas. Melalui perhitungan diketahui bahwa untuk docking menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid, diperoleh nilai hidrofobisitas sebesar 3,8. Sementara dengan menggunakan sumber asil vinil asetat diperoleh nilai hidrofobisitas sebesar 1,32.

Semakin kecil harga perhitungan tersebut, maka semakin hidrofobik senyawa yang berikatan dengan makromolekul. Sebaliknya, semakin besar harga perhitungan tersebut, maka semakin

hidrofilik senyawa yang berikatan dengan makromolekul. Hal tersebut sesuai dengan perhitungan yang dilakukan. Oleh karenanya dapat dikatakan bahwa, asam asetat anhidrid lebih bersifat hidrofilik dibandingkan vinil asetat. Hal tersebut menjadikan asam asetat anhidrid lebih bersifat polar dan mudah berikatan dengan molekul air melalui ikatan Hidrogen.

Dari uraian di atas, dapat dikatakan bahwa melalui teori docking, asam asetat anhidrid lebih mudah untuk mendonorkan asil kepada menthol jika dibandingkan dengan vinil asetat.

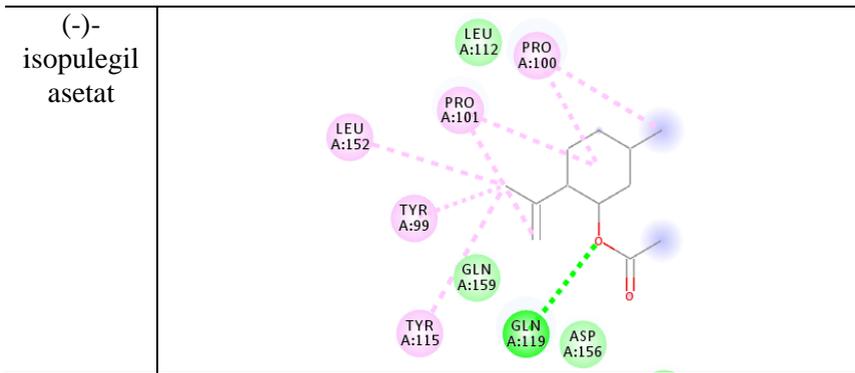
#### 4.2.5 Interaksi antara Produk dengan Makromolekul



**Gambar 4.21** Hasil docking campuran (a) (-)-isopulegyl asetat (b) l-menthyl asetat dengan makromolekul

**Tabel 4.5** Model interaksi 2D antara (-)-isopulegyl asetat dengan reseptor Triacylglycerolacylhydrolase 3TGL

Ligan	2D-Interaction ( $r = \text{Å}$ )
-------	--------------------------------------



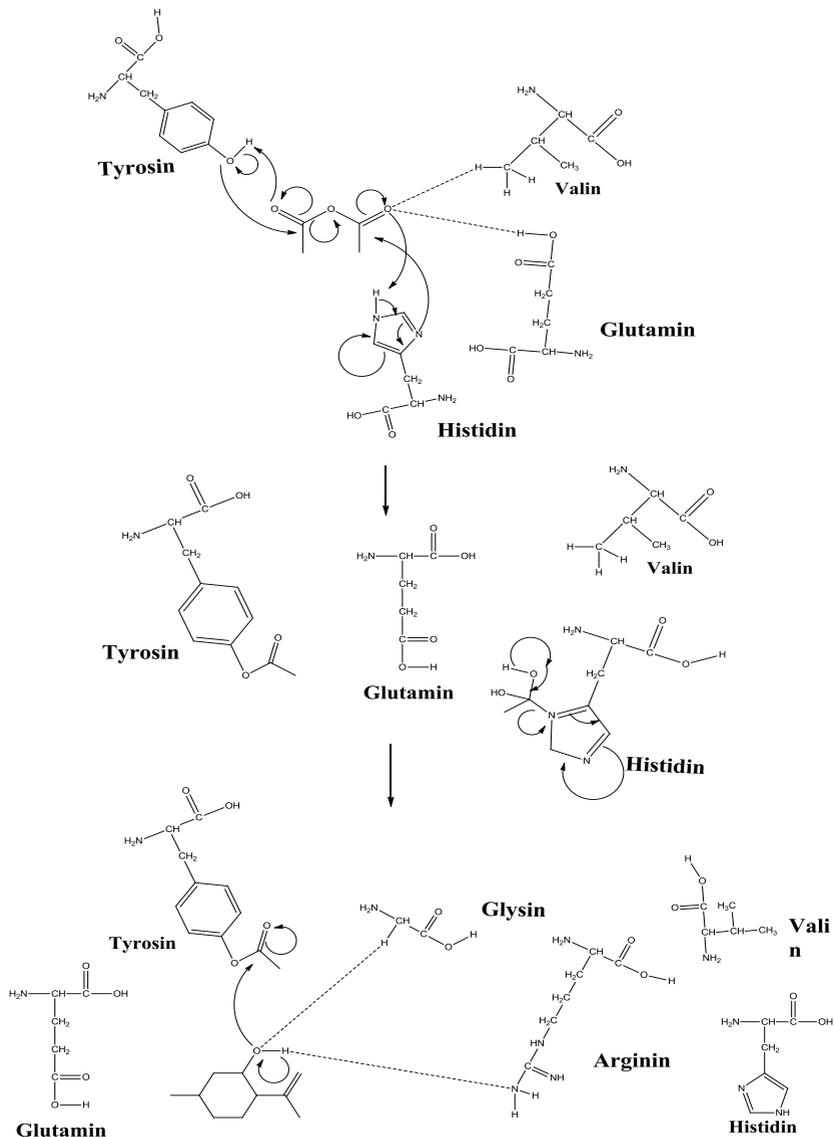
**Tabel 4.6** Model interaksi 2D antara l-mentil asetat dengan reseptor Triacylgiserolacylhydrolase 3TGL

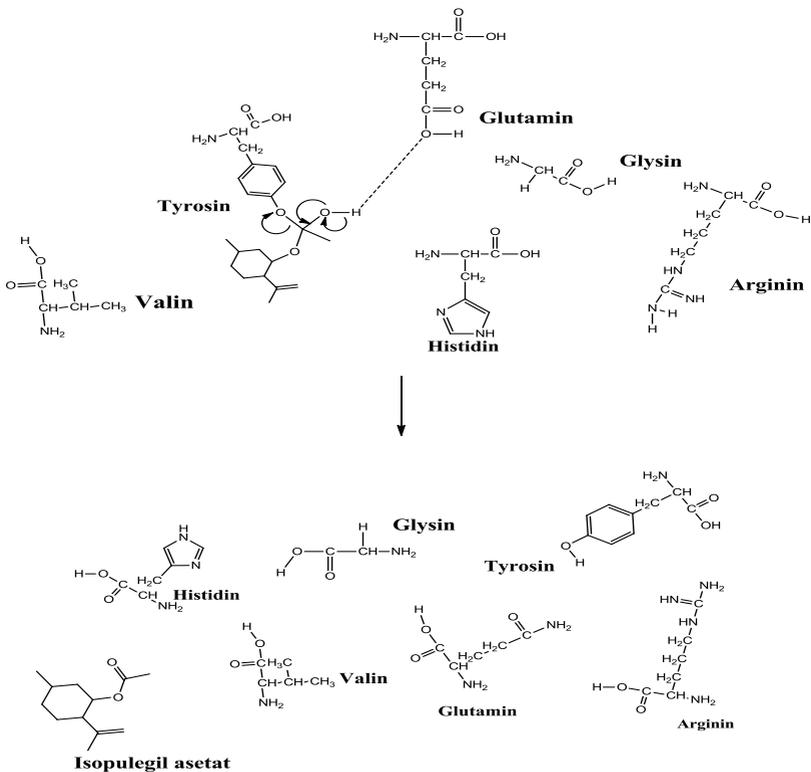
Ligan	<i>2D-Interaction</i> ( $r = \text{Å}$ )
l-mentil asetat	

Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa sisi aktif yang berikatan dengan (-)-isopulegил asetat adalah glutamin melalui ikatan Hidrogen. Glutamin mengikat O asil dari (-)-isopulegил asetat. Sedangkan pada l-mentil asetat, sisi aktif yang berikatan melalui ikatan hidrogen yaitu tyrosin, threonin dan lysin. Selanjutnya, dilakukan analisis hubungan antara docking makromolekul,(-)-isopulegol, l-mentol, asam asetat anhidrida dan docking makromolekul, (-)-isopulegol, l-mentol, vinil asetat. masing-masing

dengan docking menggunakan produk untuk mengetahui mekanisme reaksi asilasi yang mungkin terjadi.

## 4.2.6 Tinjauan Analisis Mekanisme Reaksi Enzimatis Asilasi secara *In vitro* dan *In silico*

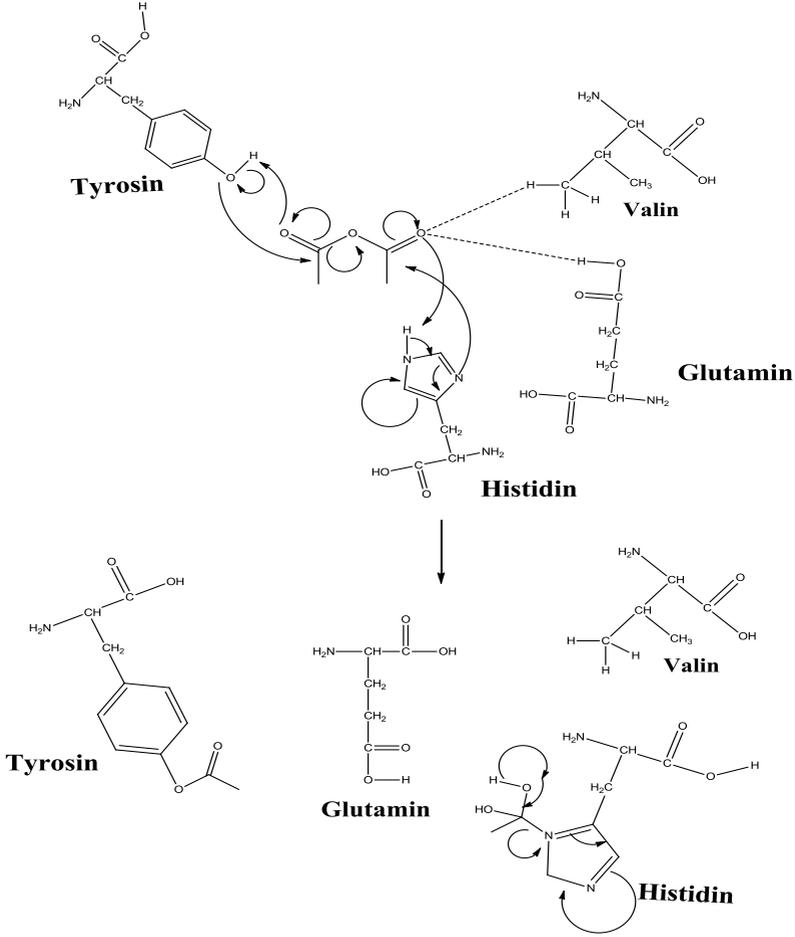


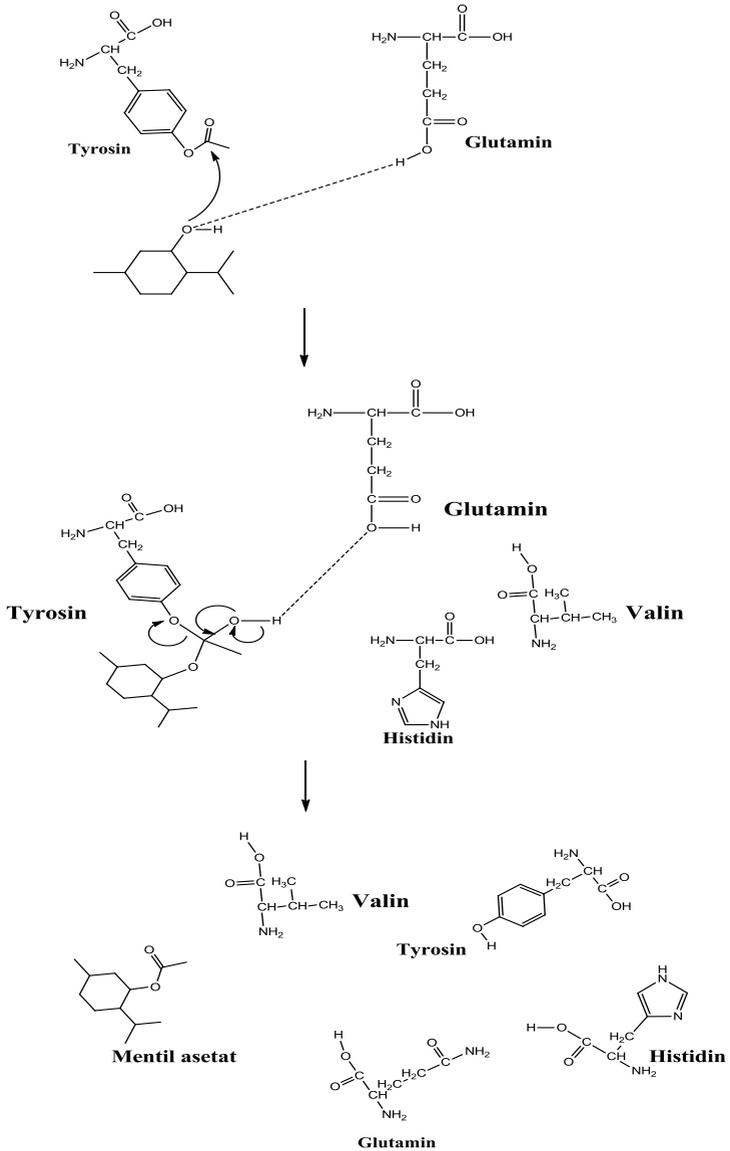


**Gambar 4.22** Mekanisme reaksi asilasi pembentukan isopulegik asetat dengan sumber asil asam asetat anhidrida

Dari mekanisme tersebut dapat dijelaskan bahwa pada awal reaksi, glutamin, tirosin, histidin, valin berikatan dengan asetat anhidrida melalui ikatan hidrogen. Hal tersebut dimungkinkan karena glutamin, tirosin, histidin dan valin merupakan sisi aktif yang bersifat hidrofilik atau polar. Sementara itu, pada tahap selanjutnya isopulegol berikatan dengan glisin dan arginin. Glisin dan arginin juga merupakan sisi aktif yang bersifat polar atau hidrofilik sehingga dapat berikatan secara hidrogen dengan O dari isopulegol.

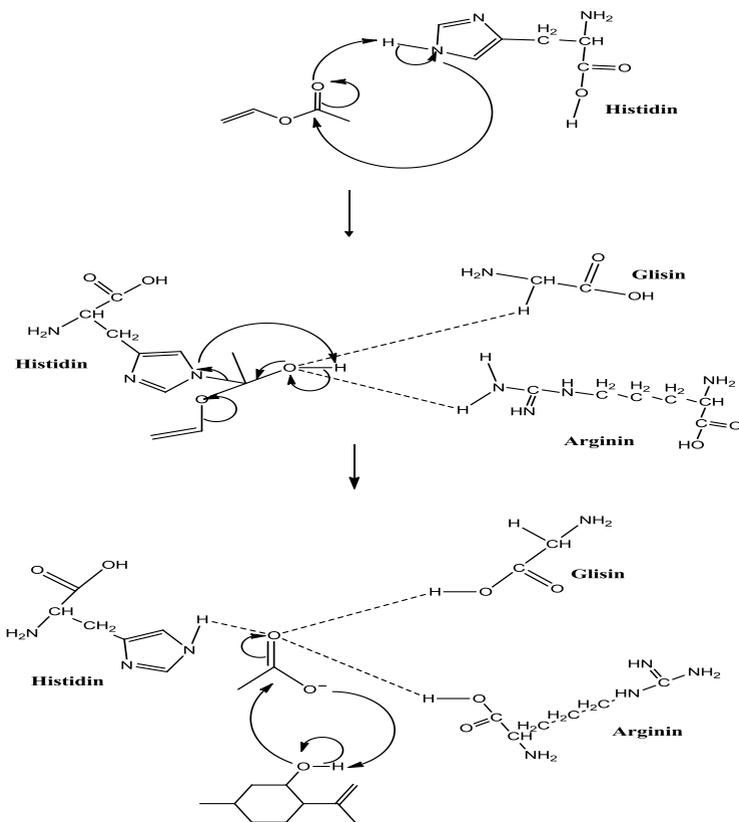
Asil yang telah terlepas kemudian berikatan dengan O isopulegol, sehingga membentuk isopulegile aetat.

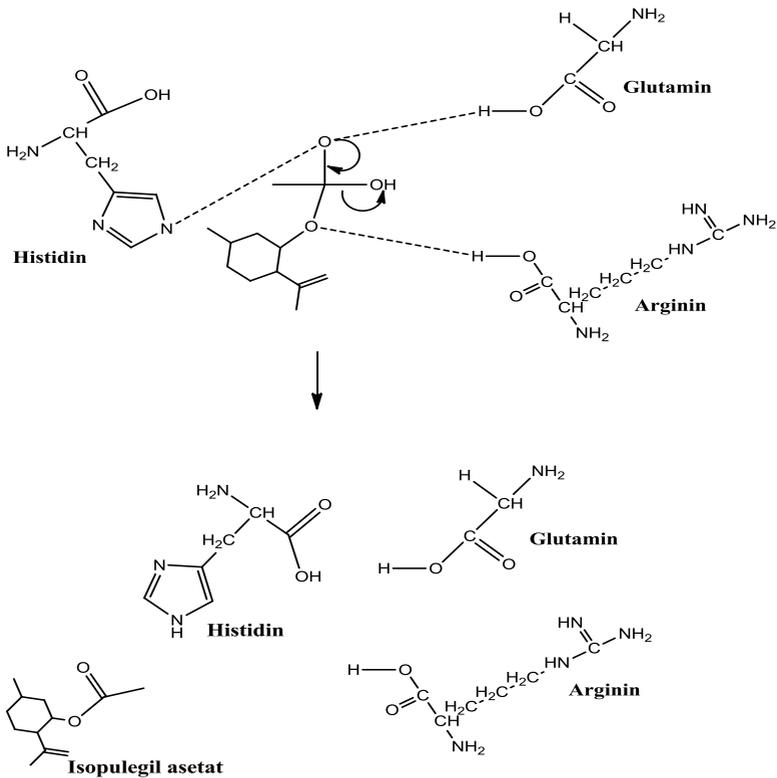




**Gambar 4.23** Mekanisme reaksi asilasi pembentukan mentil asetat dengan sumber asil asam asetat anhidrida

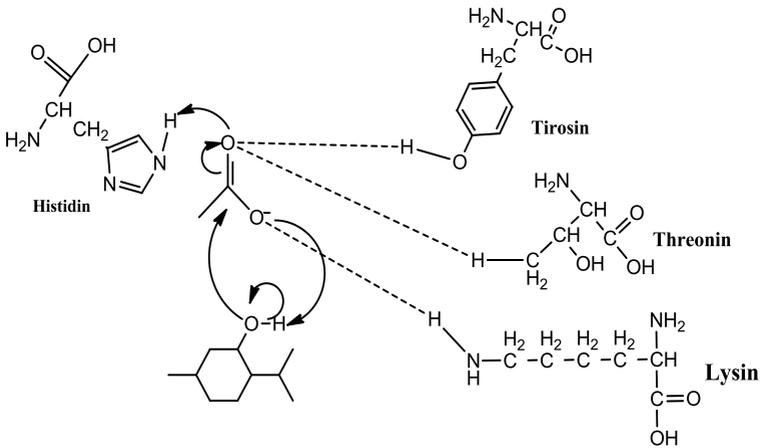
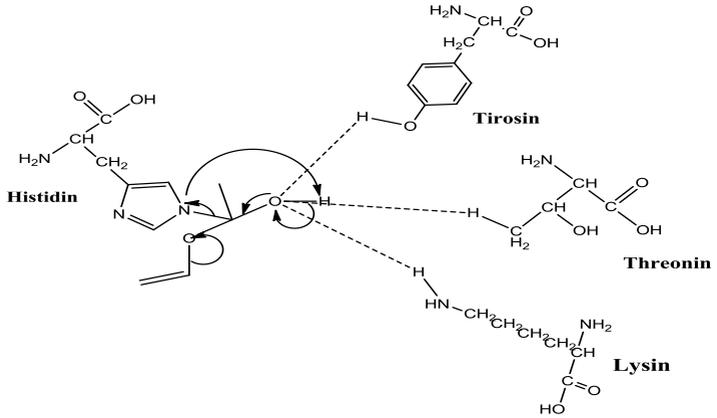
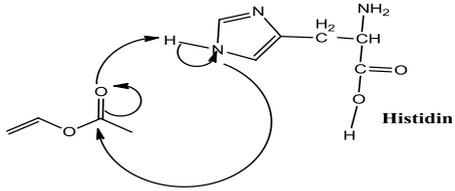
Dari mekanisme tersebut dapat dijelaskan bahwa pada awal reaksi, glutamin berikatan dengan asam asetat anhidrida melalui ikatan hidrogen. Selain itu histidin, valin dan tyrosin juga berikatan dengan asam asetat anhidrida. Hal tersebut dimungkinkan karena histidin merupakan sisi aktif yang bersifat hidrofilik atau polar begitu juga glutamin, valin dan tyrosin. Sementara itu, pada tahap selanjutnya mentol berikatan dengan glutamin dan tyrosin. Tyrosin merupakan sisi aktif yang bersifat polar atau hidrofilik, sama seperti threonin dan lisin sehingga dapat berikatan secara hidrogen dengan O dari menthol. Asil yang telah terlepas (karena sebelumnya berikatan dengan tyrosin, threonin dan lisin), berikatan dengan O menthol, sehingga membentuk menthil asetat.

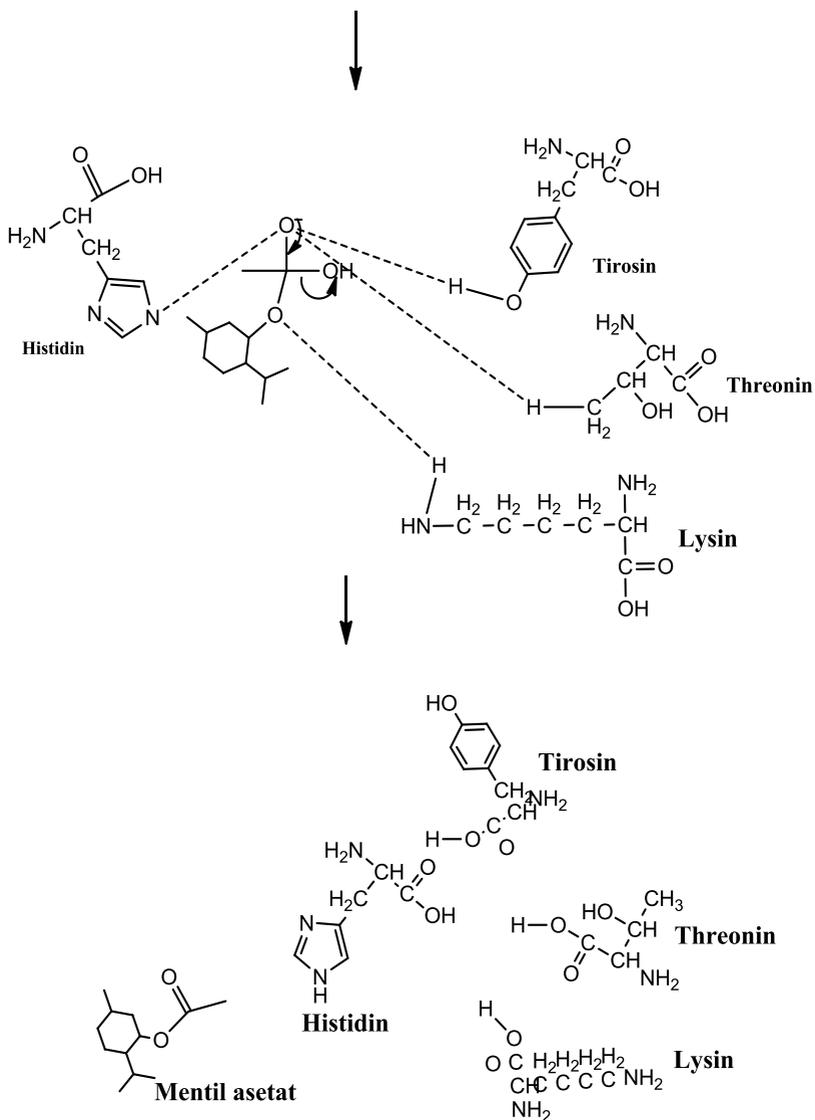




**Gambar 4.24** Mekanisme reaksi asilasi pembentukan isopulegyl asetat dengan sumber asil vinil asetat

Dari mekanisme tersebut dapat dijelaskan bahwa pada awal reaksi, histidin berikatan dengan vinil asetat melalui ikatan hidrogen. Hal tersebut dimungkinkan karena histidin merupakan sisi aktif yang bersifat hidrofilik atau polar. Sementara itu, pada tahap selanjutnya isopulegol berikatan dengan glisin dan arginin. Histidin merupakan sisi aktif yang bersifat polar atau hidrofilik, sama seperti glisin dan arginin sehingga dapat berikatan secara hidrogen dengan O dari isopulegol. Asil yang telah terlepas (karena sebelumnya berikatan dengan histidin, arginin dan lisin), berikatan dengan O isopulegol, sehingga membentuk isopulegyl asetat.





**Gambar 4.25** Mekanisme reaksi asilasi pembentukan mentil asetat dengan sumber asil vinil asetat

Dari mekanisme tersebut dapat dijelaskan bahwa pada awal reaksi, histidin berikatan dengan vinil asetat melalui ikatan hidrogen. Hal tersebut dimungkinkan karena histidin merupakan sisi aktif yang bersifat hidrofilik atau polar. Sementara itu, pada tahap selanjutnya mentol berikatan dengan tyrosin, threonin, lisin. Tyrosin merupakan sisi aktif yang bersifat polar atau hidrofilik, sama seperti threonin dan lisin sehingga dapat berikatan secara hidrogen dengan O dari menthol. Asil yang telah terlepas (karena sebelumnya berikatan dengan tyrosin, threonin dan lisin), berikatan dengan O menthol, sehingga membentuk menthil asetat.

Dari kedua mekanisme reaksi tersebut, dapat diketahui bahwa pada awal reaksi, sumber asil mengalami ikatan hidrogen terlebih dahulu dengan sisi aktif. Setelah itu, asil akan keluar dan menyerang gugus  $-C-O$  pada l-menthol sehingga terbentuk l-menthil asetat. Di akhir reaksi, sisi aktif yang berikatan dengan substrat akan terlepas dan membentuk enzim kembali.

Berdasarkan grafik selektivitas dan konversi dari uji *in vitro*, dapat diketahui bahwa (-)-isopulegil asetat dan l-menthil asetat mengalami kenaikan seiring dengan bertambahnya waktu reaksi. Apabila dibandingkan dengan hasil dari reaksi menggunakan sumber asil vinil asetat, reaksi dengan sumber asil asam asetat anhidrat lebih maksimal. Hal itu dikarenakan pada reaksi dengan vinil asetat %l-menthil asetat dan (-)-isopulegil asetat mengalami penurunan.. Sedangkan pada reaksi dengan asam asetat anhidrat, pembentukan produk semakin meningkat. Hal ini dapat dihubungkan dengan hasil dari uji *in silico*. Berdasarkan hasil uji *in silico*, ditinjau dari sisi aktif dan harga  $K_d$ , reaksi asilasi menggunakan sumber asil dari asam asetat anhidrid lebih maksimal dikarenakan sisi aktif enzim lipase tidak hanya mengikat gugus  $C=O$  asam asetat anhidrid, tetapi juga  $C-O$ . Sedangkan pada vinil asetat, sisi aktif hanya mengikat  $C=O$  vinil asetat saja efektivitas keduanya juga menjadi berbeda. Sehingga, hal tersebut mempengaruhi nilai energi gibbs. Hal itu pula yang mempengaruhi harga  $K_i$  dan menjadikan harga  $K_d$  dari asam asetat anhidrid lebih besar dibandingkan vinil asetat. Oleh karena itu, tinjauan tersebut dijadikan sebagai dasar pada uji *in vitro* dan berdasarkan hasil dari KGSM serta FTIR, diketahui bahwa reaksi asilasi menggunakan vinil asetat kurang maksimal. Sehingga, dapat

dikatakan bahwa hasil dari uji *in silico* mendukung atau sesuai dengan hasil uji *in vitro*.